

PENGEMBANGAN BIAKAN *IN-VITRO* *PLASMODIUM FALCIPARUM* SECARA KONTINU

Sekar Tuti*, Suwarni* dan Harijani A.M.*

ABSTRACT

CONTINUOUS *IN-VITRO* CULTIVATION OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*

To support malaria research on its serology/immunology, chemotherapy, drug sensitivity aspects etc. especially for falciparum malaria, a large amount of antigen (parasites) is needed. These antigen could not be obtained from patients in the field only.

Considering this situation, attempts have been made to develop a Plasmodium falciparum continuous culture in-vitro following a method introduced by Trager and Jensen (1976).

In our laboratory, the parasite grew and multiplied nicely for 60 days. During that period of cultivation, a large amount of parasites (mostly mature trophozoite and schizont stages) have been collected for antigen production. Several tubes of mostly young trophozoites stage have been preserved, it can be cultured again in the future or transported to another laboratory for further culture.

PENDAHULUAN

Pada tahun 1912 Bass dan Johns untuk pertama kali melaporkan adanya pertumbuhan *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) dalam darah yang ditambah dengan glukosa dari stadium cincin menjadi stadium sizon¹.

Setelah itu, berbagai usaha telah dilakukan untuk dapat membiakkan secara terus-menerus (continuous) *P. falciparum* stadium eritrositer, akan tetapi tidak berhasil. Enam puluh tahun kemudian usaha ini baru menunjukkan

kemajuan dengan berhasilnya Haynes dkk. pada tahun 1976 serta Trager dan Jensen pada tahun yang sama, membiakkan parasit tersebut di laboratorium^{2,3}.

Hasil penelitian-penelitian tersebut, terutama hasil penelitian Trager dan Jensen telah memberikan arah yang lebih baik bagi penelitian malaria pada manusia. Metoda mereka memungkinkan para peneliti di seluruh dunia untuk mempelajari lebih lanjut aspek-aspek lain dari penyakit malaria seperti

* Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.

biokimia, serologi/imunologi, kemoterapi dan lain-lain.

Dengan berkembangnya penelitian penyakit malaria di Indonesia terutama dalam aspek-aspek serologi/imunologi, sensitivitas terhadap obat, penemuan obat tradisional dan lain-lain, dirasakan perlu untuk mengembangkan (kultur) *P. falciparum* di laboratorium untuk memenuhi kebutuhan akan antigen (parasit) tersebut.

Di Indonesia sampai saat ini baru laboratorium US-NAMRU Jakarta yang telah berhasil membiakkan *P. falciparum* secara terus-menerus⁴. Pada tahun 1981 Dakung LS, dkk. telah melakukan pembiakan yang berasal dari berbagai sumber seperti: darah penderita, dari laboratorium lain yang di preservasi ataupun yang dikirim dalam media transport, akan tetapi hasilnya belum memuaskan⁵.

Oleh karena itu, pada tahun 1990 dengan fasilitas laboratorium dan reagen yang ada dan dapat diperoleh di Indonesia, telah dilakukan percobaan pengembangbiakan parasit *P. falciparum* di laboratorium Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.

Telah diketahui bersama bahwa suatu teknik/metoda tertentu yang berhasil dengan baik di suatu laboratorium belum tentu menghasilkan keadaan yang sama di laboratorium lain dengan kondisi dan fasilitas yang sama, apalagi bila segala sesuatunya berbeda.

Dalam upaya memenuhi kebutuhan akan *P. falciparum* untuk menunjang penelitian-penelitian tersebut di atas, maka percobaan pengembangbiakan ini dilakukan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Plasmodium falciparum yang dibiakkan diperoleh dari laboratorium US NAMRU yang berasal dari seorang penderita di Irian Jaya, parasit ini sudah berkembang-biak dengan baik dan dalam jangka waktu lama di laboratorium tersebut.

Pengembangbiakan dilakukan dengan metoda Trager dan Jensen melalui tahapan sebagai berikut :

1. Pembuatan media:

Media dibuat dengan melarutkan 10,4 gram (g) bubuk RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin (Gibco) dalam 960 aquabidestilata steril (Kimia Farma) dan ditambah dengan 5,94 g N-2-hydroxy ethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (Hepes, Merck) untuk mendapatkan kepekatan 25 mM dengan pH 6,75. Kemudian ditambahkan 50 mg gentamisin (Prafa laboratories, Jakarta, Indonesia) dan larutan disucihamakan dengan filtrasi melalui membran millipore yang berdiameter 0,22 mikro meter/um (Millipore corporation, Bedford, MA 01730). Media ini kemudian di aliquote (dibagi dalam volume yang lebih kecil) secara aseptik ke dalam botol-botol yang steril, masing-masing sebanyak 100 ml dan disimpan dalam suhu 4 derajat Celcius (C).

Sebelum dipakai, 100 ml media tersebut ditambah dengan 4,2 ml larutan NaHCO_3 5% untuk mendapatkan media tanpa serum dengan pH 7,4 yang untuk selanjutnya disebut dengan RP.

Untuk membuat media yang lengkap, ditambah dengan 11,5 ml serum/plasma manusia, dan disebut sebagai RP + HS.

2. *Penyediaan sel darah merah tanpa parasit (tidak terinfeksi).*

Sel darah merah (SDM) tanpa parasit dalam anti koagulan citrat fosfat dextrose (cpd) didapat dari donor dengan golongan darah O.

Darah dipusingkan (centrifuge) selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm (rotation per minute) dalam suhu kamar. Plasma dan buffcoat dipindahkan. Endapan (SDM) dicuci dengan media RP sebanyak 2 kali dengan sentrifugasi masing-masing dengan waktu, kecepatan dan suhu yang sama dengan yang telah disebutkan di atas.

Sel darah merah golongan O (SDM-O) yang sudah dicuci ditambah dengan media yang lengkap (RP + HS), dengan volume sama (1:1).

3. *Penyediaan sel darah merah yang berparasit (terinfeksi).*

Sel darah merah yang terinfeksi dicuci dengan cara yang sama dengan SDM yang tidak terinfeksi seperti tersebut di atas, dan untuk selanjutnya ditambah dengan RP + HS dengan volume yang sama pula.

Kepadatan parasit ditentukan dengan menghitung jumlah parasit per 3000 SDM pada usapan darah tipis yang sudah dicat dengan

bahan pewarna Giemsa (perbandingan Giemsa stock dengan buffer adalah 1:14; pengecatan dilakukan selama 15 menit).

4. *Penyediaan serum.*

Sera dari darah yang didapatkan dari Para donor darah di Lembaga Palang Merah Indonesia, Kramat Raya-Jakarta, dipisahkan dari SDM dengan cara sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm dan dalam suhu kamar. Sera dipisahkan dengan cara aseptik, dan disimpan dalam botol/tabung dengan jumlah tertentu dan disimpan pada suhu -20 derajat Celcius.

5. *Cara pengembangbiakan/kultur.*

Sejumlah suspensi dari 50% campuran antara SDM yang tidak terinfeksi dengan yang terinfeksi diencerkan dengan media RP + HS untuk mendapatkan 4% hematokrit dengan kepadatan parasit 2%.

Suspensi ini dimasukkan ke dalam cawan petri yang bergaris tengah 50 mm masing-masing sebanyak 4 ml. Biakan diinkubasi pada 37 derajat Celcius dengan teknik candle jar dari Trager dan Jensen.

Setiap 24 jam media diganti dengan media yang segar sebanyak 3,5 ml dan dibuat sediaan darah (usapan tebal dan tipis) untuk memantau pertumbuhan parasit. Sedangkan penambahan SDM-O dilakukan setiap 4 hari sekali.

6. *Penilaian hasil biakan.*

Biakan dianggap berhasil bila parasit dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik seperti di laboratorium tempat parasit tersebut mula-mula dibiakkan.

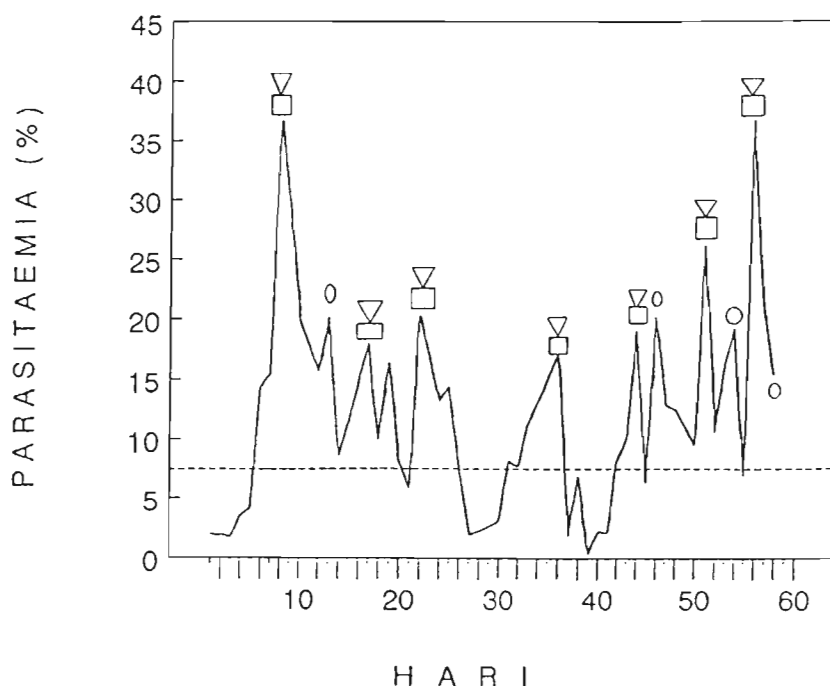
Persentase parasit merupakan hasil bagi dari jumlah SDM yang terinfeksi per 3000 total SDM (yang terinfeksi dan tidak terinfeksi) dikalikan 100%.

HASIL

Kepadatan parasit pada awal pembiakan adalah 2%. Pada minggu pertama pembiakan, pertumbuhan parasit tidak baik (parasitaemia hanya berkisar antara 1,7 dan 5,2%). Hal ini

disebabkan oleh karena tidak dilakukan penambahan SDM-O setelah pembiakan dilakukan selama 4 hari, sehingga SDM berkurang dan merozoit tidak mempunyai tempat untuk tumbuh, akibatnya banyak yang mati (Gambar 1).

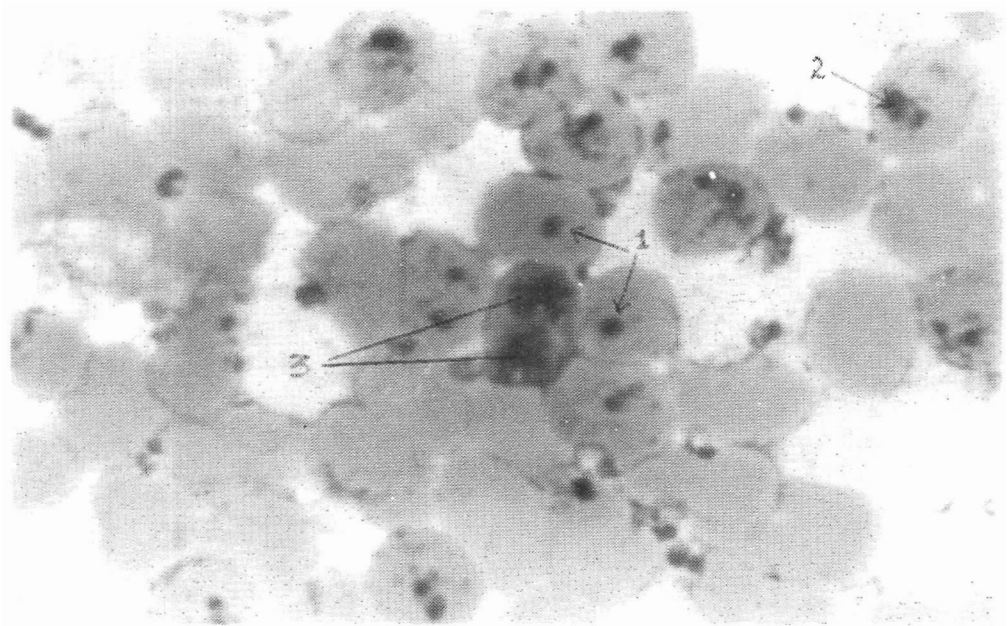
Setelah dilakukan penambahan SDM-O secara teratur setiap 4 hari, pertumbuhan parasit menjadi lebih baik seperti yang terlihat pada grafik 1.



Keterangan :

- saat panen
- ▽ biakan dipisah (sub kultur)
- saat preservasi

Grafik 1. Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* (Strain 2300) di Laboratorium, Selama November 1990 – Januari 1991.



Keterangan: Ujung panah 1 = stadium ring yang mati
2 = stadium trofozoit mati
3 = stadium sizon mati

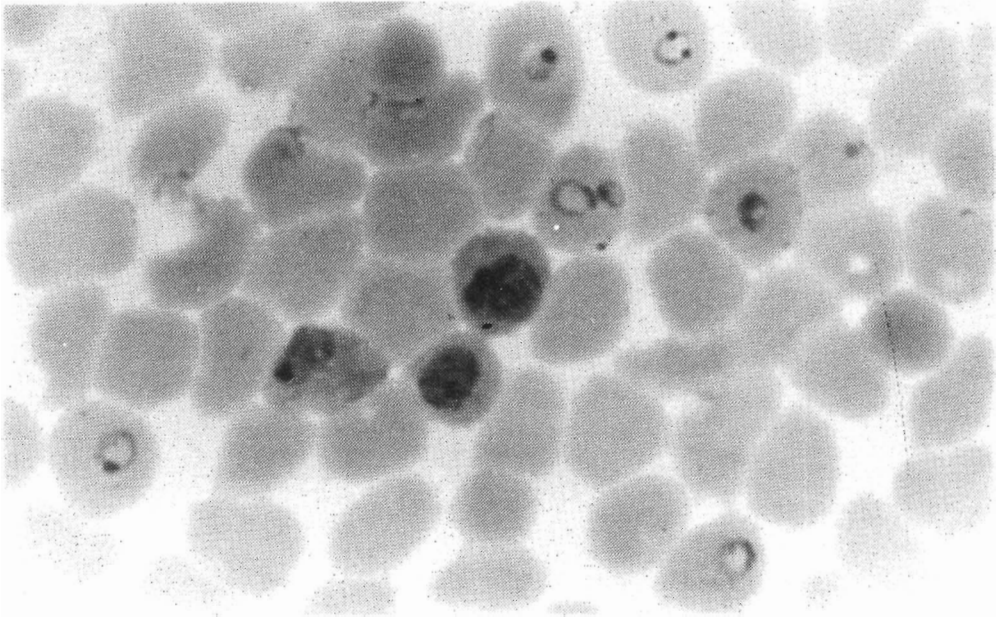
Gambar 1. Parasit banyak yang mati karena terlalu padat, sehingga kekurangan nutrisi dan sel darah merah untuk tempat tumbuhnya.

Stadium parasit pada awal pembiakan tidak sama (ada stadium cincin, trofozoit maupun sizon), sehingga pertumbuhan menjadi tidak seragam dan kepadatan parasit hampir selalu tinggi, di atas 7,5% (Gambar 2, grafik 1).

Pada hari ke-39 kepadatan parasit menurun dengan tajam, biakan hampir mati semua, kepadatan parasit hanya tinggal 0,24%.

Keadaan ini terjadi akibat kesalahan teknis yang sama dengan yang telah disebutkan di atas, yaitu terlambat menambah SDM-O karena kurangnya persediaan sel darah tersebut. Dengan penambahan SDM-O dan perlakuan biakan yang cermat, pertumbuhan parasit menjadi baik lagi (Grafik 1).

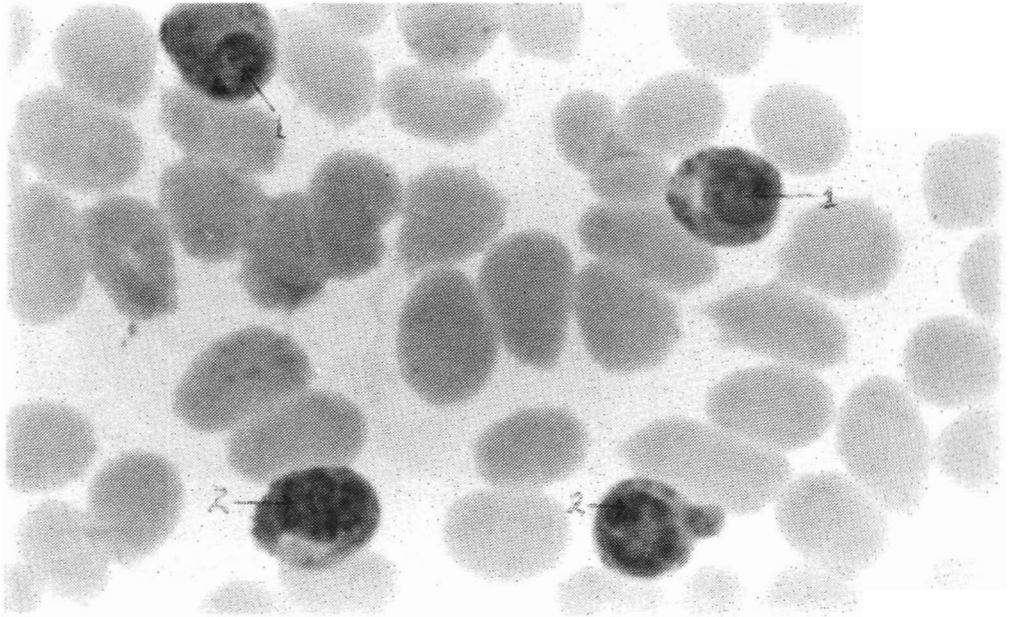
Pembiakan dilakukan sampai dengan hari ke-60. Untuk pembuatan antigen, parasit dipanen setelah mencapai kepadatan 7,5% atau



Gambar 2. Berbagai stadium *Plasmodium falciparum* dalam biakan (ring, trofozoit dan sizon).

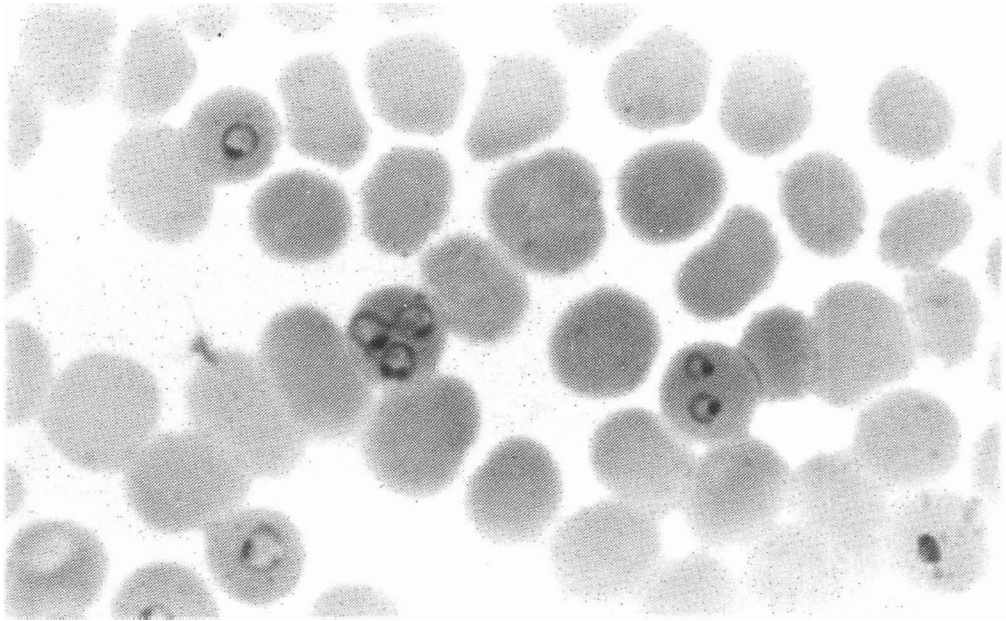
lebih yang sebagian besar terdiri dari stadium trofozoit tua atau sizon dalam jumlah yang banyak (15-25 cawan petri biakan), seperti yang terlihat pada gambar 3. Disamping itu juga dilakukan penyimpanan parasit yang sebagian besar terdiri dari stadium trofozoit muda

(Gambar 4) dengan cara menambahkan suspensi cryopreservative pada endapan SDM yang mengandung parasit dengan perbandingan 1:1. Campuran ini disimpan di dalam tabung liquid nitrogen untuk dibiakkan lagi apabila diperlukan.



Keterangan: Ujung panah 1 = stadium trofozoit
2 = stadium sizon

Gambar 3. Stadium trofozoit dan sizon yang dipanen untuk pembuatan antigen.



Gambar 4. Stadium ring/trofozoit muda yang dipreservasi dalam tangki *liquid nitrogen*.

PEMBAHASAN

Plasmodium falciparum yang dibiakkan pada kesempatan ini adalah parasit yang sudah "adapted" (sudah dibiakkan dalam jangka panjang) di laboratorium US NAMRU Jakarta, sehingga diharapkan akan lebih mudah dibiakkan di laboratorium lain⁴. Meskipun pendapat ini tidak selalu sesuai dengan kenyataan yang ada, mengingat adanya beberapa faktor yang ikut berperan.

Pada umumnya masalah yang dihadapi oleh beberapa laboratorium di Indonesia

termasuk dalam hal ini laboratorium Pusat Penelitian Penyakit Menular (P3M), Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan adalah alat/fasilitas dan reagensia yang tersedia. Sebagai contoh di laboratorium US NAMRU semua alat/*glass ware* hanya dipakai satu kali (disposable) dan untuk pembuatan media dipakai "water for injection" yang didatangkan dari luar. Di laboratorium P3M seperti halnya laboratorium-laboratorium lain di Indonesia, hampir semua peralatan dipakai lebih dari satu kali (dicuci dan diucirkan setiap kali habis dipakai untuk kemudian dipergunakan lagi).

Media dibuat dengan menggunakan pelarut *aquabidestilata* produksi PT. Kimia Farma.

Dengan berhasil tumbuhnya biakan *P. falciparum* di laboratorium penulis, kelihatannya perbedaan peralatan/fasilitas maupun reagensia bukan merupakan faktor yang berpengaruh, selama ketentuan-ketentuan yang ada pada prosedur pembiakan diperhatikan dan dilakukan dengan saksama. Hal-hal yang harus diperhatikan antara lain adalah: cara pencucian dan sterilitas peralatan (*glass ware*), waktu penggantian media, penambahan SDM-O, pemisahan biakan (*sub culture*) apabila parasit sudah terlalu padat dan sebagainya.

Beberapa kesalahan telah penulis perbuat antara lain keterlambatan penambahan SDM-O sehingga banyak parasit yang mati, dan biakan terkontaminasi bakteri oleh karena pemakaian alat yang sterilitasnya tidak terjamin. Dengan penanganan yang lebih saksama keadaan ini bisa diatasi dan parasit bisa tumbuh kembali dengan baik.

Salah satu kendala dalam pengembangan biakan *P. falciparum* ini adalah bahwa penggantian media harus dilakukan setiap hari, sehingga pada hari Minggu atau hari libur pun hal ini harus dilakukan³. Beberapa peneliti telah melakukan percobaan-percobaan untuk menyederhanakan cara pengembangan biakan parasit ini.

Pada tahun 1981 Osisanya dkk. meningkatkan konsentrasi glukosa dalam media yang dipergunakannya sebanyak 2 kali konsentrasi semula dan pemakaian Tes-buffer⁶. Reber-Liske serta Schnelle & Pollack menambahkan 50 mg hypoxantine dalam satu liter media^{7,8}, dengan penambahan tersebut

media hanya perlu diganti setiap 3 hari. Nurisa I, telah menerapkan cara ini selama 1 minggu pembiakan parasit yang berasal dari lapangan (penderita *P. falciparum*) hasilnya cukup baik⁹. Hendri Astuty dkk. melaporkan bahwa dengan menaikkan kadar hematokrit sampai 6 atau 8% dan menurunkan kepadatan parasit menjadi 0,15%, penggantian media dapat ditunda sampai 72 jam¹⁰. Dengan menerapkan salah satu teknik pembiakan seperti yang tersebut di atas, diharapkan untuk selanjutnya pelaksanaannya menjadi lebih mudah dan efisien (tidak menyita terlalu banyak waktu).

Langkah/rencana berikutnya dalam kaitannya dengan pengembangan biakan *P. falciparum* untuk menunjang penelitian-penelitian penyakit malaria seperti yang tersebut di atas adalah membiakkan berbagai strain parasit tersebut dari berbagai daerah endemis di Indonesia, yang telah dimulai dengan strain dari daerah Manado (Sulawesi Utara) dan Irian Jaya.

KESIMPULAN

Dengan berhasil tumbuh dan berkembangbiaknya *Plasmodium falciparum* di laboratorium Pusat Penelitian Penyakit Menular dengan kondisi dan fasilitas yang ada, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pengembangan biakan *P. falciparum* dapat dilakukan dengan peralatan dan reagen yang tersedia di Indonesia yang relatif tidak mahal karena peralatan (*glass ware*) dapat dipakai berulang-ulang, dengan catatan bahwa semua tahap pembiakan harus dilakukan sesteril dan setepat mungkin.

2. Perlu dilakukan penyederhanaan cara/ metoda yang dipakai agar pelaksanaannya menjadi lebih ringan dan efisien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada: Dr. Suriadi Gunawan, DPH, Kepala Pusat Penelitian Penyakit Menular Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang telah memberikan saran-saran dan petunjuk, sehingga memungkinkan diterbitkannya makalah ini; Drs. Budi Leksono, staf US NAMRU Jakarta dan Dr. Rusli Muljono, staf pengajar di Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia atas semua petunjuk dan saran-saran yang telah diberikan sehingga pembiakan *P. falciparum* ini dapat berhasil dengan baik.

Terima kasih juga kami sampaikan kepada Drs. Purnomo, staf US NAMRU Jakarta yang telah memberikan petunjuk mengenai morfologi parasit dan membantu pembuatan dokumentasi hasil pembiakan.

Tidak lupa kami ucapkan terima kasih kepada Palang Merah Indonesia di Kramat Raya, Jakarta, atas bantuannya dalam penyediaan darah donor untuk memenuhi kebutuhan serum guna melengkapi media biakan dan kepada teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuannya sehingga pembiakan ini berhasil.

DAFTAR RUJUKAN

1. Bass CC and Johns FM. (1912). The cultivation of malarial plasmodia (***Plasmodium vivax*** and ***Plasmodium falciparum***) in vitro. J Exp Med, 16:567.
2. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA and Desjardin RE. (1976). Culture of human malaria parasites (***Plasmodium falciparum***). Nature (London), 263:767.
3. Trager W and Jensen JB. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science, 193: 673.
4. Dakung LS, Adjung SA, Pribadi W, Husada G, dan Bintari R. (1982). Biakan in vitro ***Plasmodium falciparum*** secara kontinu. Medika, 12;8:335-340.
5. Budi Leksono, komunikasi pribadi.
6. Osisanya JOS, Gould S and Warhurst DC. (1981). A Simplified culture technique for ***Plasmodium falciparum*** (Short communication). Annals of Trop Med and Parasitol, 75:1:107-109.
7. Reber-Liske R. (1983). A labour saving method for the in vitro culture of ***Plasmodium falciparum***. Acta Tropica, 40:39-43.
8. Schnelle V and Pollack S. (1987). Short communications. ***Plasmodium falciparum***: Improve method for continuous in vitro cultivation without daily medium replacement. Ann Trop Med Parasitol, 81:1:63-64.
9. Nurisa I. (1993). In vitro cultivation of ***Plasmodium falciparum*** without daily medium replacement. Seminar Parasitologi Nasional VII dan Konggres P4I VI, 23-25 Agustus, Den Pasar.
10. Astuty H, Sutanto I dan Muljono R. (1990). Penentuan batas waktu penggantian medium biakan in vitro ***Plasmodium falciparum***. Seminar Parasitologi Nasional VI dan Konggres P4I V, 23-25 Juni, Pandaan Pasuruan.